

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
11. Jg. 1973, S. 553—564

Die Bestimmung des Harnstoffs in Plasma und Serum (Urease/BERTHELOT-Methode) mit dem Greiner Electronic Selective Analyzer GSA II

Von R. RICHTERICH und H. KÜFFER

Chemisches Zentrallabor, Inselspital, Bern/Schweiz

(Eingegangen am 29. Juni/13. Oktober 1973)

1. Eine Urease/BERTHELOT-Methode zur Bestimmung des Harnstoffs in Serum und Plasma wurde für den Greiner Electronic Selective Analyzer GSA II adaptiert. Durch Zugabe der Urease im Leerwert-Ansatz nach dem Salicylat wird ein echter Proben- und Reagenzien-Leerwert durchgeführt.
2. Die Methode hat einen linearen Meßbereich von 0,08—75 mmol/l (0,24—210 mg Harnstoff-N/100 ml).
3. Eine Verschleppung (230 mg Harnstoff-N/100 ml zu 12 mg Harnstoff-N/100 ml) ist weder in wäßrigen noch proteinhaltigen Lösungen nachweisbar.
4. Von allen untersuchten Störfaktoren (inkl. Lipämie, Bilirubin, Aminosäuren, Medikamente) stört einzig das Vorliegen einer deutlichen Hämolyse.
5. Die Präzision ist eine Funktion der Absorbanz und fällt von 0,5% (Variations-Koeffizient) bei einer Absorbanz von 0,200, auf 1% bei einer Absorbanz von 0,1, auf 2% bei einer Absorbanz von 0,05.
6. Die Repetierbarkeit ist gleich der Reproduzierbarkeit. Sie liegt bei wäßrigen Lösungen zwischen 0,5 und 1,0%, bei klaren Seren zwischen 0,7 und 1,5% und bei trüben Proben zwischen 1 und 2% (Absorbanz über 0,1).
7. Da die Volumina, Temperaturen und Zeiten absolut festgelegt sind und die Messung absolut erfolgt, wird ohne Eichung gearbeitet.
8. Die Qualitäts-Kontrolle hat nur den Zweck, die Qualität der Reagenzien periodisch zu überprüfen.

The determination of urea in plasma and serum by a urease/BERTHELOT method, adapted to the Greiner Electronic Selective Analyzer GSA II

1. A urease/BERTHELOT method for the determination of urea in serum and plasma has been adapted to the Greiner Electronic Selective Analyzer GSA II. A sample and reagent blank is performed by adding the urease in the blank assay after the salicylate.
2. The method is linear from 0.08—75 mmol/l (0.24—210 mg urea-N/100 ml).
3. No carry over could be demonstrated using a concentration gradient from 230 to 12 mg/100 ml.
4. A number of potentially interfering factors including lipemia, bilirubin, amino acids and drugs were investigated. An interference could only be demonstrated in the presence of marked hemolysis.
5. The precision of the GSA II is a function of the absorbance. The coefficient of variation at an absorbance above 0.200 is about 0.5%. It rises with a decrease in absorbance to 1% at an absorbance of 0.100 to 2% at an absorbance below 0.050.
6. Repeatability equals reproducibility. It amounts to about 0.5—1% with aqueous solutions, to 0.7—1.5% with clear sera and to 1—2% with turbid sera (absorbance > 0.100).
7. Calibration has not been necessary during a trial period of more than six months. This is possible because volumes, timings, temperatures and measurement are fixed and absolute.
8. Quality control is used for the periodic checking of the quality of reagents only.

Die meisten der in der manuellen Analytik gebräuchlichen Methoden können für den Greiner Electronic Selective Analyzer GSA II (GSA II) adaptiert werden. Für die Bestimmung des Harnstoffs hat sich bei uns seit Jahren die Urease/BERTHELOT-Methode als besonders zuverlässig erwiesen (1). Wir berichten im folgenden über die Adaptation dieser Methode für den GSA II und über unsere damit gemachten praktischen Erfahrungen.

Material und Methoden

Chemikalien

Äthylendiamin-tetraessigsäure, Dinatrium-Salz, Di-Hydrat (EDTA)
Harnstoff
Natrium-Azid

Natriumhydroxid-Lösung, 5 mol/l
Natriumhypochlorit-Lösung (Merck, Nr. 5614, techn., etwa 13% aktives Chlor)
Natrium-Salicylat
Pentacyanonitrosylferrat [III], (Nitroprussid-Natrium) Dihydrat
Salzsäure-Lösung, 1 mol/l
Urease (Sigma Nr. U 2125 Typ VI, 1000 Sigma-U¹), 5—10 Sigma-U/mg Protein, entsprechend etwa 85—170 U/mg Protein.)

Stamm-Lösungen

1. Puffer-Lösung

10 g EDTA und 1 g Natrium-Azid werden in etwa 800 ml demineralisiertem Wasser gelöst. Mit etwa 20 ml 1 mol/l Salzsäure pH

¹⁾ 1 Sigma-U ist definiert als diejenige Enzym-Menge, die aus Harnstoff in 5 min bei 30°C 1 mg Ammoniak-N freisetzt. Ohne Temperatur-Korrektur entspricht 1 Sigma-U etwa 17 U (international).

bei 37°C auf 6,5 einstellen und mit demineralisiertem Wasser auf 1 Liter auffüllen. Bei 4°C mindestens 1 Jahr haltbar.
(Konzentrationen, mmol/l: EDTA 26,9, Salzsäure 20,0, Natrium-Azid 15,4, pH 6,5 bei 37°C)

2. Salicylat-Lösung

170 g Natrium-Salicylat werden mit demineralisiertem Wasser auf 1 Liter gelöst. Bei 4°C mindestens 1 Jahr haltbar.
(Salicylat 1,06 mol/l)

3. Hypochlorit-Lösung

Herstellung nach den Angaben von WELLER (1, 2). Bei 4°C mindestens 1 Jahr haltbar.
(Hypochlorit 140 mmol/l, „aktives Chlor“ etwa 5 g/l)

Gebrauchs-Lösungen

1. R-1, R-3: Urease-Reagenz

Vor der Verwendung werden 1000 Sigma-U Urease in 1 Liter Puffer-Lösung gelöst. Im GSA II mindestens 1 Woche haltbar.
(Konzentrationen, mmol/l: EDTA 26,9, Natrium-Azid 15,3, Salzsäure 20,0, Urease etwa 1000 Sigma-U/l, bzw. 17000 U/l, pH 6,5 bei 37°C)

2. R-2: Salicylat-Reagenz

Vor der Verwendung werden 800 mg Nitroprussid-Natrium in 1 Liter Salicylat-Lösung gelöst. Im GSA II mindestens 1 Woche haltbar.
(Konzentrationen, mmol/l: Natrium-Salicylat 1060, Nitroprussid-Natrium 2,00)

Bestimmung der Harnstoff-Konzentration mit dem GSA II

GSA II

Der GSA II ist ein absolut messender diskreter Analysator mit echter Test-Selektion (3, 4). Die vorliegenden Untersuchungen wurden mit einem Serien-Modell durchgeführt; langfristige Erfahrungen mit der gleichen Methode liegen zudem mit einem Funktions-Prototyp (Mark I) (5–7) vor, mit dem in unseren Laboratorien seit 1969 routinemäßig die Harnstoff-Bestimmungen durchgeführt wurden.

Beschreibung der Methode C UA 1²⁾

Die Methode ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt. Beim GSA II werden bei jeder Bestimmung zwei Ansätze, ein Proben-Ansatz (S, sample assay) und ein Leerwert-Ansatz (B, blank assay) in einem Paar von Prozeß-Gefäßen (I und II) durchgeführt. Bei der Harnstoff-Bestimmung entspricht Prozeß-Gefäß II dem Proben-Ansatz (S), Prozeß-Gefäß I dem Leerwert-Ansatz B. Die in Abbildung 1 angeführten Zeiten entsprechen den Sekunden vor der Messung der Absorbanz; wird die Zeit in Sekunden durch 6 dividiert, so ergibt sich die Nummer des Dispensers. Zuerst werden im Zeitpunkt 594/600 s je 20 µl Probe entnommen, mit 100 µl demineralisiertem Wasser verdünnt und in beide Prozeß-Gefäße abgegeben. In Prozeß-Gefäß II wird durch den Dispenser Nr. 94 564 s vor der Photometrie 500 µl des Urease-Reagenz R-1 abgegeben. In diesem Prozeß-Gefäß erfolgt nun die Harnstoff-Spaltung durch

²⁾ Zur eindeutigen Bezeichnung der Methoden verwenden wir einen früher veröffentlichten mehrdimensionalen Code (8). Die Abkürzung steht im vorliegenden Fall für Chemie, UREA, Methode Nr. 1.

	REAGENT	DISPENSER		VOLUME		TUBE	
		sec	nr	I	II	I	II
	S+DF (20+100)	594/600	99/100	120	120	■	■
	DF (120)	582	97	—	—	□	□
R-1	Urease Reagent	564	94	—	500	■	■
R-2	Salicylate Reagent	372	62	2000	2000	■	■
R-3	Urease Reagent	348	58	500	—	■	■
R-4	Hypochlorite Reagent	324	54	2000	2000	■	■

Abb. 1

Darstellung der Methode zur Harnstoff-Bestimmung (C UA 1)

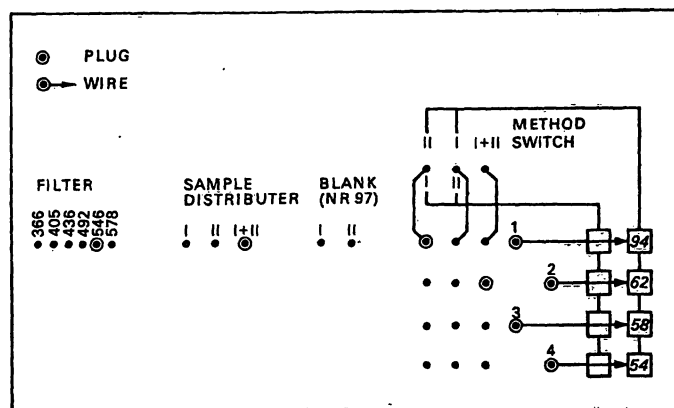


Abb. 2

Programmierung der Harnstoff-Methode C UA 1

Urease. Bei 372 s wird Salicylat-Reagenz (2000 µl) in beide Prozeß-Gefäße dosiert. Erst jetzt (348 s) wird im Leerwert-Ansatz das Urease-Reagenz zugegeben; die Urease wird durch das bereits vorliegende Salicylat inaktiviert. Durch die Zugabe des Hypochlorit-Reagenz (324 s) wird in beiden Ansätzen die Indophenol-Reaktion ausgelöst. Die End-Volumina in Prozeß-Gefäß I und II sind identisch. Alle Vorgänge sind auf 37°C thermostatisiert.

Methoden-Programmierung

Abbildung 2 zeigt schematisch die Programmier-Einrichtung des Program Panels. Mit einem Stöpsel wird das Filter 546 nm gewählt. Ein weiterer Stöpsel programmiert den Proben-Verteiler (sample distributor) so, daß Probe in Prozeß-Gefäß I und II dosiert wird. Eine Abgabe von Verdünnungs-Flüssigkeit in Prozeß-Gefäß I oder II (blank) ist nicht notwendig, da sich bereits gleiche Volumina in beiden Gefäßen befinden. Die eckigen Felder rechts außen symbolisieren die Dispenser, die im Kühlschrank bei 4°C in einer vorderen (äußeren) und einer hinteren (inneren) Reihe angeordnet sind. Die linke Reihe (mit ungeraden Nummern) entspricht den vorderen, d. h. der Bedienung am nächsten stehenden Dispensern; diese werden vor allem dann verwendet, wenn ein Reagenz häufig ersetzt werden muß. Die rechte Reihe entspricht den hinten angeordneten (geradzahlig) Dispensern. Da bei der vorliegenden Methode die Reagenzien relativ stabil sind, wurden sie alle in der hinteren Reihe untergebracht. Die Position der Dispenser muß beim Programmieren berücksichtigt werden. Wird die hintere Reihe ver-

wendet, so gilt beim Methoden-Schalter (method switch) die obere Beschriftung (II I), bei der vorderen Reihe die untere Beschriftung (I II). Diese Ziffern legen fest, ob das Reagenz in Prozeß-Gefäß I oder II dosiert werden muß. Soll das Reagenz in beide Gefäße abgegeben werden, so gilt die Beschriftung I + II, wobei die Position des Dispensers keine Rolle spielt. Dieser Verteilungs-Modus wird ebenfalls mit Stöpseln gesteckt. Zur Aktivierung der einzelnen Dispenser wird ein Kabel gesteckt, das eine Verbindung zwischen der Schalter-Platte der Methoden-Steuerung und dem betreffenden Dispenser schafft. Zum Abschluß der Programmierung muß auf der dieser Methode zugehörigen Schalter-Platte je ein Schalter in die Positionen 94, 54, 48 und 44 gesteckt werden. Die Programmierung der Dosier-Volumina erfolgt an den Dispensern durch Einstellung des Kolbenhubes.

Meß-Bedingungen

Bei der vorliegenden Methode liegen folgende End-Konzentrationen vor (mmol/l): EDTA 2,91, Natrium-Azid 1,67, Natrium-Hydroxid 1082, Natrium-Salicylat 459, Nitroprussid-Natrium 1,16, Salzsäure 2,16, Urease 108 Sigma-U/l (etwa 1840 U/l), Harnstoff 0,000346–0,325. Die Minimal-Zeiten für die einzelnen Reaktions-Schritte betragen: Urease-Inkubation >48 s, Salicylat-Reaktion = 48 s, Hypochlorit-Reaktion >270 s.

Berechnungen

Die Absorbanz-Messung erfolgt mit einem absolut stabilen Hg-Linien-Photometer. Die Bandbreite der Hg-Linie unter 1 nm ergibt zusammen mit den gewählten Filtern monochromatisches Licht. Da alle Elemente des GSA II in bezug auf Volumina, Zeit und Temperatur absolut eingestellt sind, darf, falls stabile Reagenzien verwendet werden, direkt mit Absorptions-Koeffizienten gerechnet werden. Dabei geht man am einfachsten von einem Faktor f aus, der derjenigen Zahl entspricht, mit der die Absorbanz multipliziert werden muß, um die Konzentration zu erhalten:

$$c = dA \times f.$$

Wir schreiben dA , da es sich um eine Absorbanz-Differenz zwischen den Prozeß-Flüssigkeiten I und II handelt. Für die Programmierung der Berechnung wird der Faktor f nach einer Konstanten k und einem Exponenten n aufgelöst:

$$f = k \times 10^{-n}.$$

Die Konstante k entspricht stets einer Zahlenfolge zwischen 0500 und 5000 und liegt als gedruckte Schaltung vor (method print). n gibt die Zahl der Stellen nach dem Komma und wird durch die Zahl der schraffierten Felder auf der Resultat-Karte festgelegt. Zusätzlich findet sich auf dem Method Print noch ein Potentiometer, das eine Veränderung von k um $\pm 15\%$ erlaubt.

Konstanten

ϵ (2 NH₃, 546 nm) = 7906 cm²/mmol
Mol.-Gew. Harnstoff = 60,06
Mol.-Gew. Harnstoff-N = 28,02

Proben-Volumen (SV, sample volume) = 20 μ l
End-Volumen (FV, final volume) = 4620 μ l.

Berechnungen

1. S. I. Einheit

$$c = dA \times \frac{1}{\epsilon} \times \frac{FV}{SV} \times 10^3 \text{ mmol/l}$$

$$c = dA \times 29,22$$

$$k = 2922$$

$$n = 2$$

2. Konventionelle Einheiten

$$c = dA \times \frac{1}{\epsilon} \times \frac{MG}{10} \times \frac{FV}{SV} \times 10^3 \text{ mg/100 ml}$$

Harnstoff

$$c = dA \times 175,5 \text{ mg/100 ml}$$

$$k = 1755$$

$$n = 1$$

Harnstoff-N

$$c = dA \times 81,87 \text{ mg/100 ml}$$

$$k = 0819$$

$$n = 1$$

Resultate und Diskussion

Zur Reaktions-Kinetik

Die Urease/BERTHELOT-Reaktion ist komplex. Grob lassen sich fünf Schritte unterscheiden (9):

1. der Harnstoff-Abbau durch Urease,
2. die Reaktion von Ammoniak und Hypochlorit unter Bildung von Chloramin,
3. die Kondensierung von Chloramin und Phenol zu *p*-Aminophenol und
4. die Bildung eines Leukofarbstoffes, der
5. unter Sauerstoff-Aufnahme in einen Indophenol-Farbstoff übergeht.

In einer Reihe von Versuchen wurden durch Verschieben der Dispenser in verschiedene Positionen die Reaktions-Zeiten der einzelnen Schritte variiert. Als

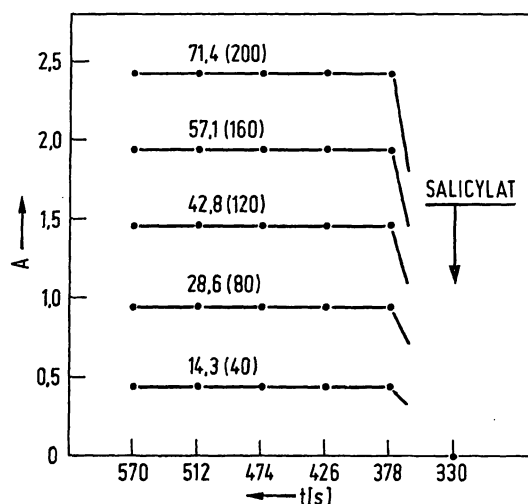


Abb. 3
Einfluß der Inkubations-Dauer mit Urease auf die Absorbanz (A).
Konzentrationen in mmol/l (mg Harnstoff-N/100 ml)

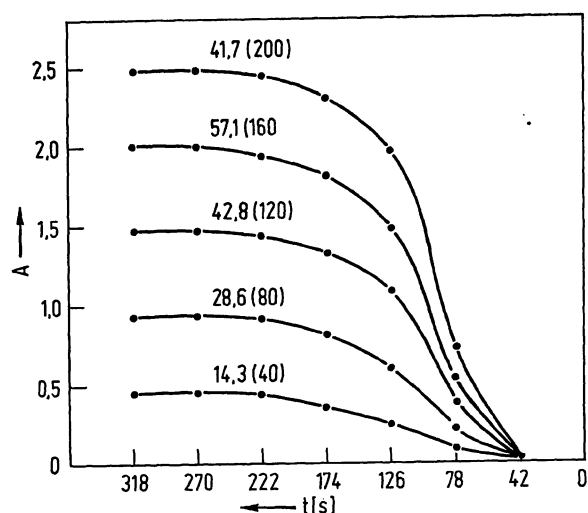


Abb. 4

Einfluß der Reaktions-Dauer mit Hypochlorit auf die Absorbanz (A).
Konzentrationen in mmol/l (mg Harnstoff-N/100 ml)

erstes wurde der Einfluß der Inkubations-Dauer mit Urease untersucht. Die Resultate sind in Abbildung 3 dargestellt. Eine Verschiebung des Urease-Dispensers R-2 von Position 570 s bis 378 s ergab keine Änderung des Resultats. Da bei 330 s das Enzym-hemmende Salicylat zugesetzt wird, genügt offenbar eine Inkubations-Dauer von 48 s zum vollständigen Abbau des Harnstoffs. Die Indophenol-Bildung wurde durch Variieren der Hypochlorit-Zugabe untersucht (Abb. 4). Je später das Hypochlorit zugegeben wird — die Zeit 0 entspricht der Messung im Photometer —, desto geringer die Farbausbeute. Unter den vorliegenden Bedingungen erwies sich eine Reaktions-Zeit von 270 s auch für hohe Harnstoff-Konzentrationen als genügend.

Die vorliegenden Untersuchungen lassen sich nur schlecht mit früheren Studien vergleichen; im GSA II liegt eine Inkubations-Temperatur von 37°C, sowie ein ununterbrochenes Mischen der Prozeß-Flüssigkeiten vor. Dies dürfte die relativ kurzen Inkubations-Zeiten erklären. FAWCETT und SCOTT (10) beobachteten bei 19°C eine maximale Farb-Entwicklung nach 30 min, bei 27°C nach 15 min und bei 37°C nach 5 min. Es sei aber darauf hingewiesen, daß unser Bestreben nicht dahin ging, eine maximale Farb-Ausbeute zu erzielen,

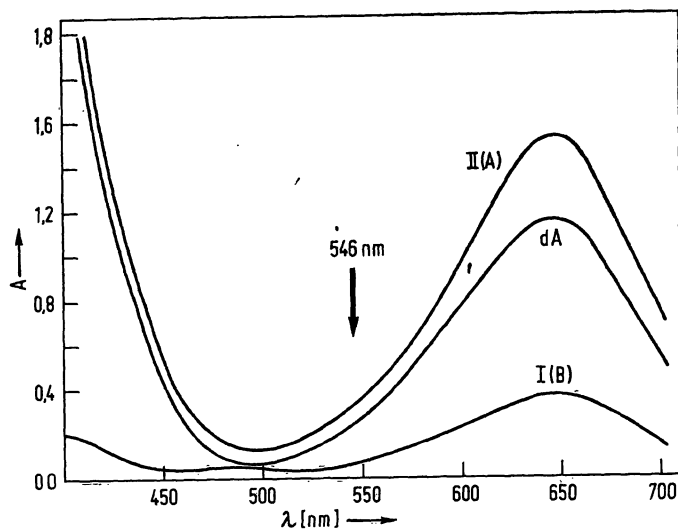


Abb. 5

Registrierung der Spektren des Leerwert-Ansatzes I (B) und des Proben-Ansatzes II (A) gegen Wasser, sowie das Differenz-Spektrum zwischen den beiden Ansätzen (dA)

sondern die Reaktions-Bedingungen so zu wählen, daß in einem End-Volumen unter 5000 µl ein möglichst großer Meß-Bereich erzielt wurde.

Optische Eigenschaften des Reaktions-Produktes

Experimentelles: Für die folgenden Untersuchungen wurde Referenz-Material des National Bureau of Standards verwendet (Standard Reference Material 912). Die Reinheit war als 99,7% deklariert. Es wurden keine Korrekturen für die Abweichung von 100% vorgenommen. Die Einwaage erfolgte, gemäß den Empfehlungen, ohne vorangehendes Trocknen des Harnstoffs. Zu Vergleichszwecken wurden auch kommerzielle wäßrige Harnstoff-Lösungen verwendet (Preciset Harnstoff, Boehringer). Zur Aufnahme der Spektren wurde ein Prozeß-Gefäß-Paar vor der Photometrie aus dem Inkubator des GSA II genommen und die Spektren mit einem Unicam SP 800 geschrieben.

Typische Spektren sind in Abbildung 5 dargestellt. Das Spektrum des Leerwert-Ansatzes (I), gemessen gegen Wasser, zeigt ein Plateau bei 645 nm. Dieses fällt gegen 510 nm und steigt dann gegen das Ultraviolette kontinuierlich an. Der Proben-Ansatz (II), ebenfalls gegen Wasser registriert, zeigt ein Maximum bei 645 nm und ein Minimum bei 510 nm. Bei den Wellenlängen 546 nm, 578 nm und 623 nm gilt das BEERSche Gesetz

Tab. 1

Linearität der Methode zur Harnstoff-Bestimmung (C UA 1). Eingewogener Harnstoff des National Bureau of Standards. Bei jeder Konzentration wurden 10 Bestimmungen durchgeführt

Soll-Werte (Einwaage) mg/100 ml	Soll-Werte (Einwaage) mmol/l	Gefundene Werte mmol/l	%	\bar{x}	Absorbanz $\pm s$	V. K. (%)
0,00	0,00	0,02		0,0002	0,00024	120,00
5,00	0,83	0,89	107,2	0,0306	0,00121	3,95
10,20	1,70	1,68	98,8	0,0575	0,00181	3,15
20,15	3,36	3,28	97,6	0,1123	0,00102	0,91
50,37	8,39	8,11	96,7	0,2777	0,00205	0,74
100,44	16,72	16,69	99,8	0,5711	0,00491	0,86
150,08	24,99	25,40	101,6	0,8692	0,00417	0,48
200,13	33,32	33,90	101,7	1,1602	0,00708	0,61
250,31	41,68	42,65	102,3	1,4596	0,00759	0,52
300,30	50,00	50,90	101,8	1,7418	0,01289	0,74
400,08	66,62	65,68	98,6	2,2479	0,02225	0,99
500,20	83,29	77,92	93,6	2,6667	0,07413	2,78
600,15	99,93	86,09	86,2	2,9464	0,13730	4,66

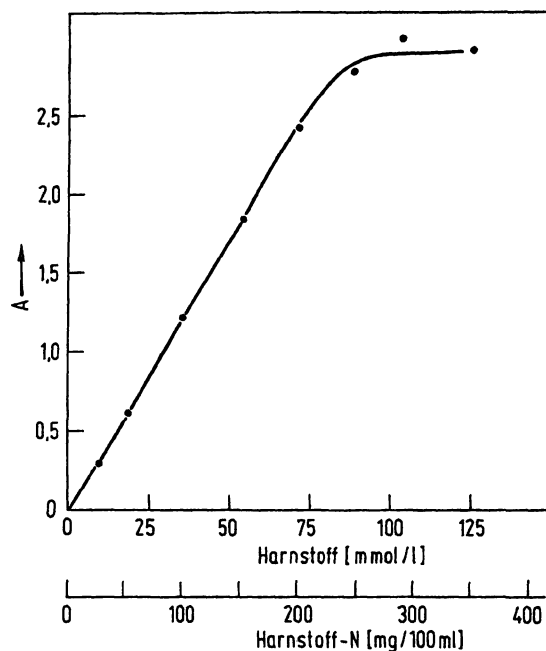


Abb. 6
Gültigkeit des BEERSchen Gesetzes

über einen weiten Meß-Bereich. Für die vorliegende Methode liegt die Empfindlichkeit bei 546 nm am günstigsten.

Ein typisches Experiment zur Ermittlung der molaren Absorptivität und des Linearitäts-Bereichs ist in Tabelle 1 und Abbildung 6 dargestellt. Die Methode ist praktisch linear bis zu Konzentrationen von 70 mmol/l, bzw. 210 mg Harnstoff-N/100 ml, bzw. 450 mg Harnstoff/100 ml. Dieser Bereich umfaßt alle je bei uns bei Patienten beobachteten Harnstoff-Werte (11), so daß sich eine Proben-Verdünnung immer erübrigt. Eine Berechnung der Regression zwischen Konzentration (mmol/l) und Absorbanz im Bereich zwischen 1 und 70 mmol/l ergab die Gerade

$$c \text{ (mmol/l)} = 0,000\,548 + 29,2204 \text{ (dA)}.$$

Das bei diesem Versuch erhaltene b (29,2204) entspricht dem Faktor (29,22). Ähnliche Resultate ergaben auch die in Tabelle 2 dargestellten Untersuchungen von Preciset. Die Übereinstimmung der Resultate betrug im Mittel 100,2%.

Aus mehreren solchen Versuchsreihen wurde ein Extinktionskoeffizient von 7906 cm²/mmol errechnet. Da dieser stark von der Konzentration der verwendeten Reagenzien, den Reaktions-Bedingungen und der Meß-Wellenlänge abhängig ist, können keine Vergleiche mit Angaben aus der Literatur durchgeführt werden.

Wahl der Leerwerte

Bei der vorliegenden Methode gelingt es, durch Zugabe des spezifischsten Reagenz, der Urease, vor und nach der Salicylat-Dosierung einen kombinierten Proben- und Reagenzien-Leerwert durchzuführen. Bei der manuellen Methode wird meist nur ein Reagenzien-Leerwert mitgeführt, der für die Eigenfarbe, sowie für einen ev. Ammoniak-Gehalt korrigiert. Hingegen hat es sich

Tab. 2

Harnstoff-Bestimmung in Preciset (Boehringer) (N=10)

Soll-Werte mg/100 ml	mmol/l	\bar{x}	Gefundene Werte, mmol/l (%)	s	V. K. (%)
20	9,346	9,304	99,6	0,1449	1,56
40	18,69	18,82	100,6	0,1685	0,90
80	37,38	38,17	102,1	0,4225	1,11
120	56,08	57,08	101,8	0,5208	0,91
160	74,77	73,04	97,7	0,5210	0,71
200	93,46	91,07	97,4	0,8310	0,91

leider eingebürgert, auf einen Proben-Leerwert zu verzichten. Dies ist nicht korrekt. Schon FAWCETT und SCOTT (10) fanden bei 30 h gefrorenen Seren einen Leerwert von 0,4 mg N/100 ml, entsprechend 0,29 mmol/l Harnstoff; bei zwei Monate gefrorenen Proben lagen die Werte zwischen 1,6 und 2,9 mg N/100 ml (0,57 und 1,03 mmol/l Harnstoff).

Spezifität der Methode

Der Begriff der *Spezifität* einer Methode hat zwei Aspekte: die *Selektivität* und die *Störanfälligkeit*.

Selektivität: Die Selektivität einer Methode ist um so größer, je kleiner die Zahl der Substanzen ist, die von der Methode erfaßt werden. Eine absolut spezifische Methode erfaßt nur eine einzige Substanz.

Störanfälligkeit: Eine Methode kann unabhängig von ihrer Selektivität durch andere Substanzen gestört werden. Diese Störungen manifestieren sich meist in einer Hemmung, seltener in einer Beschleunigung der chemischen Reaktionen. Bei den Stör-Faktoren können chemische (z. B. Formaldehyd) und physikalische (z. B. Lipämie) unterschieden werden.

Da bei genügend hohen Konzentrationen irgendwelcher Substanzen jede chemische Reaktion gestört werden kann, scheint es sinnvoll, bei der Untersuchung potentieller Stör-Faktoren jene Konzentrationen zu verwenden, die in der Medizin, sei es in diagnostischen oder therapeutischen Zusammenhängen, tatsächlich auftreten können. Da in bezug auf Selektivität und Störanfälligkeit bei der Urease/BERTHELOT-Reaktion recht unterschiedliche Meinungen vertreten werden, haben wir eine Reihe potentieller Störfaktoren nochmals untersucht.

Experimentelles: Bei allen in diesem Abschnitt referierten Untersuchungen wurden zuerst im Vergleich zur gewünschten End-Konzentration der störenden Substanzen 10mal konzentriertere Ausgangs-Lösungen hergestellt. Von diesen konzentrierten Lösungen wurden 0,1 ml, bzw. 1 ml zu je 9,9, bzw. 9,0 ml von drei verschiedenen Harnstoff-haltigen Lösungen zugesetzt. Bei jedem Versuch wurden je 6 Bestimmungen durchgeführt.

Selektivität

Da außer Harnstoff kein anderes physiologisches Substrat der Urease bekannt ist, muß die Methode a priori als sehr selektiv gelten. Dies ist jedoch nur dann der Fall, wenn ein Proben- und Reagenzien-Leerwert mitgeführt wird. Leider ist dies bei den meisten manuellen (12–13) und mechanisierten Verfahren (14–19) nicht der Fall. Da beim GSA II ein Proben- und Reagenzien-Leerwert mitgeführt wird, kann mit einer hohen Selektivität gerechnet werden.

Störanfälligkeit durch chemische Faktoren

Zur Gruppe der chemischen Stör-Faktoren gehören

1. Substanzen, die die Urease hemmen,
2. Substanzen, die eine positive BERTHELOT-Reaktion geben und
3. schließlich Substanzen, die die BERTHELOT-Reaktion unterdrücken.

1. Urease-Inhibitoren

Bekannte Urease-Hemmer sind die Fluoride (20), Formaldehyd (21) und Thymol (22). Da über Monojodacetat und Aldosan keine Angaben vorliegen, wurden auch diese Substanzen überprüft. Aldosan, ein aldehydhaltiges Desinfektionsmittel³⁾, wird meist in Konzentrationen um 0,5–2,5% verwendet.

Fluorid, Ammonium-Salz. Wird als Glykolyse-Hemmer in Konzentrationen von 2 mg/ml Blut (54,0 mmol/l) verwendet (1). Fluorid wird bald als hemmend (20), bald als in fünffacher Konzentration nicht störend (23) erwähnt.

Formaldehyd. Wird als Desinfektionsmittel meist in Konzentrationen um 2,5% (750 mmol/l) verwendet.

Monojodacetat, Natrium-Salz. Wird als Glykolyse-Hemmer in einer Konzentration von 2 mg/ml Blut (9,62 mmol/l) verwendet (1).

Thymol-Isopropanol-Lösung (10 g Thymol/90 ml Isopropanol). Thymol wird bald als störend (22), bald als ohne Einfluß (13) bezeichnet. Als Urin-Konservator werden meist 2,5% verwendet.

Die Resultate dieser Untersuchungen sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Von allen untersuchten Substanzen erwies sich einzig Formaldehyd als stark hemmend. Formaldehyd sollte daher nicht zur Desinfektion von Dispensern für die Harnstoff-Bestimmung verwendet werden. Als Desinfektionsmittel ist Aldosan zu empfehlen, das in den untersuchten Konzentrationen keine hemmende Wirkung aufwies. Nach Angaben in der Literatur sind auch die folgenden Substanzen ohne hemmende Wirkung auf die Urease: Citrat (23), EDTA (13), Heparin (23) und Oxalat (23).

2. BERTHELOT-positive Substanzen

Außer Ammoniak sind eine große Zahl von Verbindungen bekannt, die eine positive BERTHELOT-Reaktion geben: Aminosäuren (15,24), Amine (15,24), Creatin, *p*-Aminophenole, Sulfonamide (25). Eine Störung kann allerdings nur dann auftreten, wenn kein Proben-Leerwert mitgeführt wird. Dennoch wurden einige typische Beispiele untersucht.

N-Acetyl-*p*-Aminophenol, ein Phenacetin-Metabolit mit Konzentrationen bei therapeutischer Phenacetingabe um 5 mg/100 ml (0,331 mmol/l) (31).

Creatin, Monohydrat.

Glutamin.

Sulfathiazol, Natrium-Salz. Therapeutische Konzentrationen um 8 mg/100 ml (0,263 mmol/l) (27).

Wie aus den Resultaten in Tabelle 3 hervorgeht, wurden in keinem Fall eine Störung der Bestimmung beobachtet. Bei korrekter manueller Durchführung gaben die folgenden Substanzen ebenfalls keine Störung:

³⁾ Bezugsquelle: Schweiz. Gesellschaft für Antisepsie Lysoform AG, Rue de Genève 6, CH-1002 Lausanne.

Tab. 3

Einfluß einiger potentiell störender Substanzen bei der Urease/BERTHELOT-Reaktion. \bar{x} und (s) von je 6 Bestimmungen

		Konzentration (mg/100 ml)	Resultate (mg Harnstoff-N/100 ml)		
Sollwerte			8,51*) (0,207)	43,76*) (0,380)	10,67*) (0,217)
I. Urease-Inhibitoren					
Aldosan	1500	8,98 (0,473)	43,11 (0,418)	10,92 (0,148)	
	3000	8,96 (0,178)	43,79 (0,264)	10,73 (0,189)	
Ammonium-fluorid	50	8,45 (0,205)	43,92 (0,305)	11,04 (0,217)	
	500	8,36 (0,613)	42,14 (0,521)	10,55 (0,344)	
Formaldehyd	2000	5,38***) (2,690)	27,90***) (0,165)	5,98***) (0,120)	
	2500	4,02***) (0,173)	22,18***) (0,154)	4,22***) (0,110)	
Thymol-Iso-propanol	500	8,44 (0,959)	44,23 (1,040)	10,93 (0,874)	
	5000	8,74 (0,914)	43,50 (0,738)	10,76 (0,994)	
II. BERTHELOT-positive Substanzen					
N-Acetyl- <i>p</i> -aminophenol	15,1	8,73 (0,472)	42,43 (0,452)	11,03 (0,609)	
	151	8,50 (0,592)	43,33 (0,787)	10,94 (0,768)	
Creatin	14,9	8,21 (0,123)	43,45 (0,302)	10,68 (0,149)	
	149	8,12 (0,123)	43,10 (0,302)	10,70 (0,149)	
Glutamin	14,6	8,75 (0,190)	43,70 (0,343)	10,63 (0,177)	
	146	8,87 (0,183)	43,80 (0,353)	10,75 (0,283)	
Sulfathiazol	30,4	7,77 (1,024)	43,58 (1,536)	10,82 (0,937)	
	304	8,59 (0,281)	43,66 (0,237)	10,67 (0,177)	
III. Inhibitoren der BERTHELOT-Reaktion					
Chlor-amphenicol	3,23	7,79 (0,381)	43,60 (0,562)	10,49 (0,213)	
	32,3	7,81 (0,191)	42,85 (0,582)	10,42 (0,181)	
Harnsäure	16,8	8,94 (0,158)	42,90 (0,194)	10,37 (0,231)	
	168	9,09 (0,190)	42,89 (0,370)	10,37 (0,173)	
Phosphat	13,8	8,65 (0,118)	44,06 (0,406)	11,02 (0,262)	
	138	8,49 (0,256)	44,15 (0,404)	10,87 (0,241)	
Salicylat	500	7,96 (0,241)	42,76 (0,280)	10,77 (0,287)	
	5000	7,96 (0,237)	42,76 (0,363)	10,76 (0,268)	
Streptomycin	5,81	7,84 (0,381)	42,98 (0,308)	10,37 (0,279)	
	58,1	7,91 (0,256)	42,85 (0,731)	10,54 (0,135)	

*) Wäßrige Lösungen.

**) Kontroll-Serum.

***) Signifikante Hemmung.

Acetyl-Salicylat, Alanin, Arginin, Creatinin, Glucosamin, Guanidin, Histidin, Lysin, Phenylalanin und Sulfadiazin (13).

3. Inhibitoren der BERTHELOT-Reaktion

Die Komplexität der BERTHELOT-Reaktion läßt vermuten, daß diese relativ störanfällig ist. Nach Angaben in der Literatur ist bei folgenden Substanzen mit Störungen zu rechnen: Ammoniumchlorid (28), Bilirubin (10,19), Chloramphenicol (23), „Hämolyse“ (10, 15, 19), Harnsäure (15), Phosphat (28) und Streptomycin (23).

Bilirubin. Zur Untersuchung wurden Misch-Versuche mit einem Bilirubin-haltigen Kontroll-Serum (20,8 mg/100 ml) und einem Bilirubin-freien Serum, beide mit einer Harnstoff-Konzentration von 18,4 mg/100 ml durchgeführt.

Chloramphenicol. Therapeutische Konzentrationen um 10 mg/100 ml (0,309 mmol/l) (23). Soll stören (24), jedoch erst in 25-fachen therapeutischen Konzentrationen (23).

Hämolyse. Die Hämoglobin-Konzentration bei hämolysefreiem Plasma liegt um 1 mg/100 ml, bei Serum um 10 mg/100 ml (1). Aus frischem Venen-Blut wurden die Erythrocyten abzentrifugiert, und 2mal mit physiologischer Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Das Konzentrat wurde durch mehrmaliges Gefrieren und Auftauen hämolysiert und einem hämolysefreien Serum zugesetzt. Die Hämoglobin-Konzentrationen wurden photometrisch gemessen (1).

Harnsäure. Diagnostische Plasma-Konzentrationen bis 1,19 mmol/l. Phosphat(Natrium-Dihydrogen-Phosphat, Dihydrat). Diagnostische Plasma-Konzentrationen bis 6,46 mmol/l.

Streptomycin. Therapeutische Plasma-Konzentrationen um 5,8 mg/100 ml (1 mmol/l) (27). Soll stören (24), jedoch erst in 25-fachen therapeutischen Konzentrationen (23).

Die Resultate dieser Untersuchungen sind in den Tabellen 3–5 zusammengestellt. Keine Störungen konnten beim Bilirubin, Chloramphenicol und Streptomycin festgestellt werden. Nach Angaben aus der Literatur gilt dies auch für Penicillin (23), Chlortetracyclin (23), Oxytetracyclin (23) und Protein (24).

Ein merkwürdiger Stör-Effekt wird beim Vorliegen einer Hämolyse beobachtet. Es ist seit einigen Jahren bekannt, daß die Resultate bei der Urease-BERTHELOT-Reaktion zu niedrig ausfallen, falls eine Hämolyse vorliegt und ein Proben-Leerwert mitgeführt wird (1). Wird ein Proben-Leerwert weggelassen, so werden die Resultate bei manuellen Methoden (10), beim Auto-Analyzer (15) und dem C 4 (19) zu hoch. Auch beim GSA II stört das Vorliegen einer Hämolyse, wie aus Tabelle 5 hervorgeht. Diese Störung ist vor allem bei niedrigen Harnstoff-Konzentrationen auffallend und nimmt proportional mit steigender Konzentration ab. An der oberen Grenze der Norm ist bei einer Hämoglobin-Konzentration von 50 mg/100 ml mit einer Hemmung von etwa 10% zu rechnen, bei Hämoglobin-

Tab. 4

Einfluß von Bilirubin auf die Harnstoff-Bestimmung (N=4)

Bilirubin μmol/l	mg/100 ml	Harnstoff		mg/100 ml
		mmol/l	s	
41,00	2,40	6,574	0,0942	18,45
54,89	3,21	6,485	0,0770	18,20
119,4	6,98	6,885	0,1141	19,33
199,2	11,65	6,494	0,0674	18,23
280,9	16,43	6,547	0,0178	18,38
355,6	20,80	6,556	0,1008	18,40

Tab. 5

Einfluß einer Hämolyse auf die Harnstoff-Bestimmung (N=4)

Hämoglobin		Harnstoff		Hemmung	
mmol/l	mg/100 ml	mmol/l	mg/100 ml		%
		\bar{x}	s		
1. Versuchsreihe					
562	905	26,56	0,089	74,54	24,0
231	373	30,13	0,547	84,86	13,8
117	188	33,39	0,282	93,70	4,5
24,8	40,0	33,72	0,453	94,64	3,5
0	0	34,95	0,364	98,10	0
2. Versuchsreihe					
562	905	10,56	0,050	29,62	39,3
231	373	10,60	0,120	29,74	39,0
117	188	11,34	0,142	31,84	34,8
24,8	40,0	14,44	0,188	40,52	17,0
0	0	17,39	0,050	48,80	0

Konzentrationen von 100 mg/100 ml von etwa 15%. Mit steigender Harnstoff-Konzentration fällt dieser Fehler. Der Mechanismus dieser Hemmung ist unklar. Möglicherweise kommt es zu einer Kompetition des Hämoglobins und des Leukofarbstoffes um den vorliegenden Sauerstoff.

Physikalische Stör-Faktoren

An erster Stelle ist hier die Lipämie zu erwähnen, die zu falsch hohen Resultaten führen kann (13, 15).

Experimentelles: In unseren Laboratorien wird Blut in Ammonium-Heparinat-Röhrchen entnommen und routinemäßig 3 min bei 15000 g zentrifugiert. Ist der Überstand trüb, so wird anschließend 20 min bei 15000 g zentrifugiert. Bei den Zentrifugationen auftretende Überstände werden mit der Wasserstrahlpumpe abgezogen.

Der Einfluß der Lipämie wurde bei einigen in der Routine anfallenden trüben Seren untersucht. Es wurde zunächst eine Bestimmung in den trüben Specimen durchgeführt und anschließend im durch Zentrifugation geklärten Material. Die Resultate dieser Untersuchungen sind in Tabelle 6 zusammengestellt. Es ließen sich keine Unterschiede in der Harnstoff-Konzentration zwischen den trüben und den geklärten Specimen nachweisen. Bei einem Specimen wurde der Harnstoff auch in der bei der Zentrifugation auftretenden Rahmschicht bestimmt. Es wurde im trüben Plasma, im geklärten Plasma und in der

Tab. 6

Der Einfluß einer Lipämie auf die Harnstoff-N-Bestimmung

Pat.	Triglyceride mg/100 ml	Cholesterin mg/100 ml	Harnstoff-N, mg/100 ml	
			Zentrifugation 15000 g 3 min	20 min
S. V.	420	268	22,7	22,8
M. V.	307	179	36,4	34,8
S. O.	458	298	37,7	39,3
K. B.	990	386	5,7	5,8
L. W.	1812	555	5,5	5,5
S. A.	585	256	3,5	3,5
P. E.	3510	323	10,3	10,7
T. D. *)	981	248	46,0	46,0
B. E.	390	1028	11,4	11,3
S. E.	303	324	15,7	15,8

*) Nach der 2. Zentrifugation lag eine Rahmschicht vor. Eine Bestimmung in dieser Schicht ergab 45,0 mg/100 ml.

Rahmschicht die gleiche Konzentration gemessen. Diese Beobachtung läßt vermuten, daß der Harnstoff in den wäßrigen und lipiden Phasen homogen verteilt vorliegt.

Beeinflussung

Bei allen bisher bekannten Analysatoren kann eine Beeinflussung, vor allem eine Verschleppung nachgewiesen werden (11). Zur Messung einer möglichen Verschleppung beim GSA II haben wir die Versuchsanordnung von BROUGHON et al. (29) gewählt (Abb. 7). Verwendet wurden ein Serum mit etwa 230 mg Harnstoff-N/100 ml und ein Serum mit etwa 12 mg Harnstoff-N/100 ml. Beide Seren wurden in je 5 Specimen-Gefäße verteilt. Die Proben mit tiefer Konzentration wurden als $t_1 \dots t_5$, diejenigen mit hoher Konzentration als $h_1 \dots h_5$ bezeichnet. Es wurden nun ohne Unterbruch Bestimmungen in der Reihenfolge $t_1 \dots t_5 h_1 \dots h_5$ durchgeführt. Dieser Versuch wurde 10mal wiederholt. Die Resultate wurden in folgende Formeln eingesetzt:

a) Verschleppung von hoch nach tief

$$E = \frac{t_1 - t_5}{h_5 - t_5}$$

b) Verschleppung von tief nach hoch

$$E = \frac{h_5 - h_1}{h_5 - t_5}$$

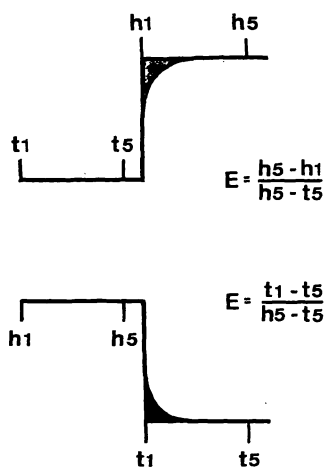


Abb. 7

Schematische Darstellung der Versuchsanordnung zur Messung der Beeinflussung

Bei der Auswertung zeigte sich, daß der Wert im Zähler bald positiv, bald negativ wurde: eine Gesetzmäßigkeit war nicht nachweisbar. Um die Versuchsanordnung empfindlicher zu gestalten, wurden als nächstes die arithmetischen Mittel aus den 10 Versuchs-Gruppen berechnet (Tab. 7) und die in die erwähnten Formeln eingesetzt. Wie aus Tabelle 7 hervorgeht, wurden die Resultate — zufällig — negativ. Aufgrund mehrerer Wiederholungen solcher Versuche mit Konzentrations-Gefällen h/t bis zu 50, die alle keine signifikanten Resultate ergaben, glauben wir zum Schluß berechtigt zu sein, daß beim GSA II eine Verschleppung nicht nachweisbar ist.

Eine Erklärung für das Fehlen einer Verschleppung dürfte auf folgende technische Einzelheiten zurückzuführen sein:

1. Der GSA II besitzt keine Durchfluß-Küvette, sondern ist, mit Ausnahme des Proben-Entnehmers, völlig diskret konstruiert.
2. Bei der Proben-Entnahme wird die mit Probe kontaminierte Spitze sowohl innen als auch außen gewaschen.
3. Der Proben-Entnehmer taucht — unabhängig vom Füllstand — stets 0,5 mm unter die Proben-Oberfläche ein. Die Einstellhöhe der Spitze des Proben-Entnehmers wird durch eine Füllstand-Messung gesteuert.

Das Fehlen einer Verschleppung beim GSA II macht Verschleppungskontrollen und ev. Korrektur-Maßnahmen überflüssig.

Richtigkeit

Zur Überprüfung der Richtigkeit der Resultate wurden drei Gruppen von Versuchen herangezogen. Zunächst wurden mehrmals Eichsubstanzen eingewogen und die Konzentrationen gemessen. Über die Resultate solcher Versuche wurde bereits oben berichtet. Als zweites wurden mehrere kommerzielle Kontroll-Seren analysiert. Eine Reihe solcher Versuche sind in Tabelle 8 zusammengestellt. Der Nutzen solcher Versuche ist allerdings gering: die als richtig deklarierten Werte differieren in einzelnen Fällen über 20%. Die mit dem GSA II ermittelten Resultate liegen durchwegs an der unteren Grenze der Erwartungswerte. Diese Beobachtung machen wir seit Jahren, da wir auch bei der manuellen Methode (1) einen Proben-Leerwert mitführen und dadurch etwas niedrigere Resultate erhalten als bei den Methoden ohne Proben-Leerwert. Durch Umprogrammieren ließe sich dieser Leerwert beim

Tab. 7

Versuch zur Messung einer Beeinflussung (Verschleppung) bei der Harnstoff-Bestimmung ($N=5$). Es sind nur die arithmetischen Mittel angeführt

Versuchsreihe	t_1	t_5	h_1	h_5	$E (\downarrow)$	$E (\uparrow)$
1	11,7	12,0	232,1	232,1	-0,136	0
2	12,1	12,1	231,3	226,8	0	-2,096
3	12,1	12,2	226,9	226,6	-0,047	-0,140
4	12,2	12,4	232,1	232,1	-0,091	0
5	11,9	12,1	232,1	232,1	-0,091	0
6	11,8	12,1	232,1	231,3	-1,369	-3,650
7	11,7	11,6	232,1	232,1	0	0
8	11,9	11,9	232,1	226,8	0	-2,466
9	11,7	11,6	224,4	232,1	0,045	3,492
10	11,6	11,6	231,3	232,1	0	0,363
\bar{x}	11,87	11,96	230,65	230,41	-0,041	-0,110

Tab. 8
Bestimmung des Harnstoff-N in kommerziellen Kontroll-Seren

Serum	Art*)	Methode	Deklarierte Werte \bar{x}	$\pm 2s$	\bar{x}	Gefundene Werte s	V. K. (%)
Patho-trol ¹⁾ (PT-64 A—Z)	F	GENTZKOW-MASEN	31,7	29,7—33,7	26,94	0,190	0,74
		KAWERAU	28,9	26,9—30,9			
		AA (N-1a)	30,1	28,1—32,1			
		BERTHELOT	30,4	28,4—32,4			
Lab-trol ¹⁾ (LT 40 A—Z)	F	GENTZKOW-MASEN	13,0	11,6—14,4	13,53	0,208	1,61
		KAWERAU	15,5	14,3—16,7			
		AA (N-1c 1/11)	16,0	14,9—17,1			
		DAM	15,7	13,7—17,7			
		BERTHELOT (Merck)	16,4	14,4—18,4			
		BERTHELOT (Boehringer)	14,0	12,0—16,0			
		SMA 12/60	14,0	13,6—14,4			
Moni-trol I ¹⁾	L	GENTZKOW-MASEN	13,4	12,5—14,3	11,90	0,118	1,04
		KAWERAU	13,3	12,4—14,2			
		AA (N-1c 1/11)	14,0	13,6—14,6			
		DAM	14,2	12,8—15,8			
		BERTHELOT (Merck)	14,9	12,5—15,5			
		BERTHELOT (Boehringer)	14,0	13,4—14,4			
		SMA 12/60	14,0	13,6—14,4			
Moni-trol II ¹⁾	L	GENTZKOW-MASEN	39,4	37,1—41,7	38,06	0,527	1,45
		KAWERAU	41,5	38,4—44,5			
		AA (N-1c 1/11)	40,7	39,2—42,2			
		DAM	41,5	37,5—45,5			
		BERTHELOT (Merck)	39,6	35,6—43,6			
		BERTHELOT (Boehringer)	41,0	38,7—42,3			
		SMA 12/60	41,0	38,7—42,3			
Versatol ¹⁾	L		12,0	11,4—12,6	7,95	0,132	1,74
Versatol Pediatric ²⁾	L		12,0	11,4—12,6	7,95	0,266	6,36
Seronorm ³⁾ (Nr. 118)	L	AA N-1C	23,8	22,4—24,8	21,17	0,197	0,98
Pathonorm A ⁴⁾ (Nr. 10)	L	AA N-1C	100,5	88,8—112,1	100,3	0,720	0,75
Pathonorm B ⁴⁾ (Nr. 10)	L	AA N-1C	8,2	7,0—9,3	6,88	0,150	2,29
Precinorm S ⁴⁾ (Nr. 102)	L	BERTHELOT (Boehringer)	14,5	13,1—16,0	12,96	0,179	1,48
Kontroll-Serum ⁵⁾ (Human, C 0431)	F	AA	15,0		12,61	0,149	1,24
		BERTHELOT	17,1				
		BERTHELOT (Roche)	17,1				

*) F: flüssig, L: lyophilisiert; ¹⁾ Dade; ²⁾ Warner-Lambert; ³⁾ Nyegard; ⁴⁾ Boehringer, Mannheim; ⁵⁾ Hoffmann-La Roche.
AA = AutoAnalyzer; DAM = Diacetylmonoxim

GSA II leicht weglassen, doch glauben wir nicht, daß es richtig ist, einen Fehler in Kauf zu nehmen, nur weil sich dies unkorrekterweise eingebürgert hat.

Ein dritter Weg zur Richtigkeits-Kontrolle liegt im Vergleich von mit zwei verschiedenen Methoden erhaltenen Resultaten. Dabei hat sich bei uns die folgende Versuchs-Anordnung besonders bewährt:

1. Mit einer manuellen Methode werden echte, blinde (nicht in Serie) Doppel-Bestimmungen durchgeführt.
2. Am gleichen Tag werden mit dem GSA II ebenfalls Doppel-Bestimmungen vorgenommen.
3. Als erstes wird das Mittel der Differenzen der Doppel-Bestimmungen (\bar{x}_{Diff}) und die Standard-Abweichung dieser Differenzen (s_{Diff}) ermittelt. Diese Daten können als Maß für die Reproduzierbarkeit der beiden Methoden dienen. Soll ein Variations-Koeffizient berechnet werden, so darf nicht das arithmetische Mittel der Differenzen (\bar{x}_{Diff}) eingesetzt werden, sondern das arithmetische Mittel der Mittelwerte der Doppel-Bestimmungen.
4. Nach Berechnung der Mittelwerte der Doppel-Bestimmungen (\bar{x}_M) wird die Korrelation zwischen den beiden Methoden berechnet.

Die Resultate einer solchen Auswertung sind in Tabelle 9 zusammengestellt. Der Variations-Koeffizient lag bei der manuellen Methode bei 9,66% bei einem Mittel von 24,95 mg Harnstoff-N/100 ml und einer Standard-Abweichung von $\pm 2,07$ mg Harnstoff-N/

Tab. 9

Vergleichs-Doppel-Bestimmungen mit einer manuellen Methode (Urease/BERTHELOT) und dem GSA II. Resultate in mg Harnstoff-N/100 ml

Methode	Manuell	GSA II
N	2 × 100	2 × 100
\bar{x}	24,95	24,90
\bar{x}_{Diff}	1,771	0,253
s_{Diff}	2,070	0,277
V. K. (%)	8,30	1,11

100 ml. Beim GSA II betrug die Standard-Abweichung $\pm 0,278$ mg Harnstoff-N/100 ml bei einem Mittel von 24,90 mg Harnstoff-N/100 ml, der Variations-Koeffizient 1,11%. Die Regressionsgerade zwischen den Mitteln der Doppelbestimmungen betrug

$$c(\text{GSA II}) = 0,018 + 0,9972 c(\text{manuell}).$$

Der Korrelations-Koeffizient betrug 0,9972, a wich nicht signifikant von null ab.

Präzision

Zum Begriff der Präzision

Die Präzision einer Methode ist durch eine Reihe von Fehlern (E) gegeben. Die wichtigsten sind:

E_{SPECIMEN} Der Specimen-Fehler: Wir verstehen darunter nicht den Volumen-Fehler bei der Proben-Entnahme, sondern Fehler, die durch eine inhomogene Verteilung der zu analysierenden Substanz im Specimen bedingt sind.

E_{CAL} Der Kalibrier-Fehler: Bei Methoden, bei denen kalibriert werden muß, überträgt sich jeder Fehler in der Eichung auf die Resultate.

E_{METH} Der Methoden-Fehler: Hierher gehören vor allem ungenügende Haltbarkeit und Qualität der Reagenzien.

Aus diesen Einzel-Fehlern berechnet sich der Gesamt-Fehler

$$E = \sqrt{E_{\text{SPECIMEN}}^2 + E_{\text{CAL}}^2 + E_{\text{METH}}^2 + E_{\text{EQUIPM}}^2 + E_{\text{INSTR}}^2 + E_{\text{PERS}}^2}$$

Da bei Analysatoren Geräte und Instrumente meist als eine Einheit vorliegen, empfiehlt es sich bei groben Betrachtungen, die entsprechenden Fehler unter dem Begriff des „apparativen Fehlers“ oder des „Analysator-Fehlers“ (E_{APP}) zusammenzufassen.

Die Einführung von Analysatoren diene vor allem dem Zweck, die persönlichen Fehler zu eliminieren. Viel mehr wird mit den einfacheren Analysatoren nicht erreicht, da nach wie vor kalibriert werden muß und auch der apparative Fehler, man denke an die Verschleppung, den Drift, die ungenügende Temperatur-Kontrolle usw., kaum verbessert wurde. Beim GSA II ist jedoch die Situation grundsätzlich anders, da die Messungen absolut erfolgen und ein Kalibrieren entfällt. Der Fehler setzt sich daher nur noch aus den folgenden Komponenten zusammen:

$$E = \sqrt{E_{\text{SPECIMEN}}^2 + E_{\text{METH}}^2 + E_{\text{APP}}^2}$$

Der apparative und methodische Fehler

Der apparative Fehler und die einzelnen Fehler-Komponenten können beim GSA II relativ leicht gemessen werden. Man verwendet dazu eine Methode, bei der der Fehler möglichst klein ist, also z. B. eine einfache Verdünnung mit anschließender Photometrie. Wir möchten jedoch auf diese grundsätzlichen Fragen später im Zusammenhang eingehen und verzichten bei den vorliegenden Ausführungen auf eine Differenzierung zwischen dem apparativen und dem methodischen Fehler.

Zur Analyse des apparativen und methodischen Fehlers geht man am besten vom Studium einer Eichkurve aus. Dazu können z. B. die in Tabelle 1 dargestellten Daten verwendet werden. Da für die vorliegenden Überlegungen die Konzentrationen relativ unwichtig sind und die Absorbanzen im Vordergrund stehen, wurden in Tabelle 1 nur die relevanten Daten über die den einzelnen Konzentrationen entsprechenden Absorbanzen angeführt. Werden diese Daten, wie in Abbildung 8 dargestellt, d. h. mit der Absorbanz auf der Abszisse und den Standard-Abweichungen auf der Ordinate, so wird eine Gerade mit der Gleichung

$$Y_{\text{SD}} = 0,000\,698 + 0,005\,805\,A$$

erhalten. Die Standard-Abweichung dieser Geraden betrug 0,001, der Korrelations-Koeffizient 0,959. Auf

E_{EQUIPM} Der Geräte-Fehler: Dieser setzt sich aus den Fehlern aller eingesetzter Geräte wie Pipetten, Dosierer, Waagen, Wasserbäder usw. zusammen.

E_{INSTR} Der Instrumenten-Fehler: Jedes Meß-Gerät hat seine spezifische Fehler-Charakteristik.

E_{PERS} Der persönliche Fehler: Die Summe aller jener Fehler, die auf absolute oder relative menschliche Unzulänglichkeiten zurückzuführen sind. Hierher gehören vor allem Abweichungen im Dosieren und im Timing.

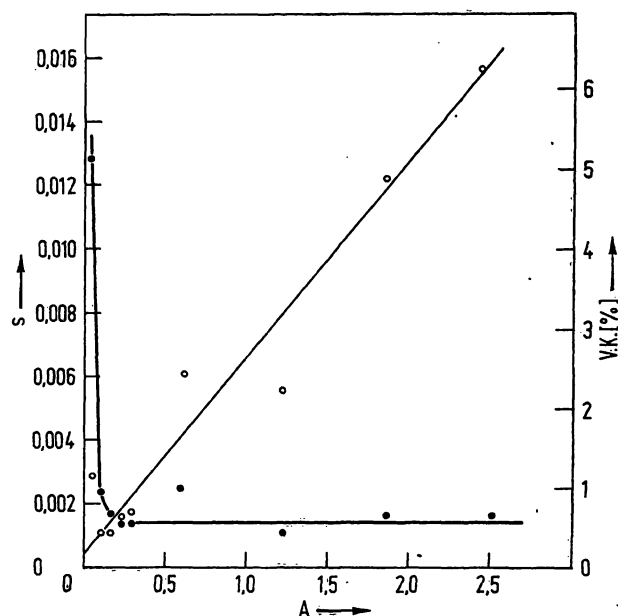


Abb. 8

Standard-Abweichung s der Absorbanz (O—O) und Variations-Koeffizient (%) der Absorbanz (●—●) als Funktion der Absorbanz (A). Die Daten stammen aus Tab. 1

der rechten Skala sind die entsprechenden Variations-Koeffizienten angeführt. Aus dieser Darstellung, die für die Charakterisierung vieler Geräte (z. B. Dosierer), Meß-Instrumente (z. B. Photometer) und aller Analysatoren verwendet werden kann, ergeben sich eine Reihe von Folgerungen:

1. Die Darstellung zeigt zunächst, daß die Fehlergröße (als Standard-Abweichung) eine lineare Funktion der Absorbanz ist.
2. Der Gesamt-Fehler setzt sich aus einem konzentrationsunabhängigen Teil — dem Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate — und einem konzentrations-abhängigen Teil zusammen.
3. Der konzentrations-unabhängige Teil wird am einfachsten dadurch ermittelt, daß eine Lösung mit Konzentration null, z. B. Wasser untersucht wird. Dieser Wert kann höchstens zufällig null sein, da jedes Meß-Instrument auch um null einen Fehler aufweist. Beim GSA II beträgt dieser Fehler in Absorbanz 0,003 (2 s). Wird diese Absorbanz mit dem Methoden-Faktor multipliziert, so ergibt sich für jede beliebige Methode die untere Nachweisgrenze.
4. Der konzentrations-abhängige Teil des Fehlers entsteht überall dort, wo Konzentrationen eine Rolle spielen, also bei der Proben-Entnahme, beim chemischen Prozeß und im Meßinstrument. Durch eine geeignete Versuchsanordnung können die einzelnen Komponenten ermittelt werden.

5. Die Angabe von Variations-Koeffizienten zur Charakterisierung von Methoden und Instrumenten ist gefährlich. Da eine Division durch null unendlich gibt, müßte im Idealfall bei einer Konzentration von null auch der Variations-Koeffizient unendlich groß sein. Bei den in dieser Arbeit referierten Versuchen lag dieser Wert zwischen 50 und 200%.

6. Bei zunehmender Absorbanz fällt der Variations-Koeffizient ab, um sich dann auf einem bestimmten Wert zu stabilisieren. Beim GSA II liegen bei der Harnstoff-Bestimmung die Variations-Koeffizienten im Absorbanz-Bereich von 0,1 bis 2,0 zwischen 0,5 und 1,0% (wäßrige Lösungen).

7. Bei sehr hohen Absorbanzen wird der Variations-Koeffizient wieder ansteigen. Dies ist aus chemischen Gründen (Gültigkeit des BEERSchen Gesetzes nur für stark verdünnte Lösungen) und aus meßtechnischen Überlegungen zu erwarten.

Der Specimen-Fehler

Wiederholt wurde beobachtet, daß bei gleicher Absorbanz die Standard-Abweichungen von Plasmen höher liegen als diejenigen von wäßrigen Lösungen. Noch größere Streuungen werden bei lipämischen Proben beobachtet. Dies könnte methodisch bedingt sein, z. B. durch eine Trübung, doch haben wir keinerlei Anhaltspunkte für eine solche Erklärung. Wir müssen vielmehr annehmen, daß die Inhomogenität des Untersuchungsmaterials eine Rolle spielt. Offenbar ist bei der Verwendung von $2 \times 20 \mu\text{l}$ Plasma oder Serum gerade noch mit einer genügend exakten Dosierung zu rechnen, doch beginnt sich bereits die Inhomogenität des Untersuchungsmaterials geltend zu machen. Es scheint uns daher fragwürdig, ob zur Untersuchung von Plasma oder Serum das Proben-Volumen noch weiter reduziert werden darf.

Repetierbarkeit

Unter Repetierbarkeit verstehen wir die Abweichung der Resultate einer Bestimmungs-Reihe mit der gleichen Probe, die durch eine Laborantin, mit den gleichen Lösungen, der gleichen Eichung, am gleichen Tag, und mit einem Gerät in Serie durchgeführt wird. Man hat hier auch von „Präzision in der Serie“ gesprochen (11).

Wie aus zahlreichen Versuchen hervorgeht, liegt die Repetierbarkeit im optimalen Meßbereich zwischen 0,5 und 1,0% für wäßrige Lösungen, zwischen 0,7 und 1,5% bei Plasma und zwischen 1 und 2% bei trüben Specimen.

Reproduzierbarkeit

Die in dieser Arbeit angeführten Versuche wurden neben den Routinearbeiten auf dem GSA II im Laufe von 3 Monaten ohne Eichung ermittelt. Daraus geht hervor, daß die Reproduzierbarkeit gleich der Repetierbarkeit ist. Wir haben bereits früher (11) darauf hingewiesen, daß bei echter Vollmechanisierung, d. h. Ausschaltung aller personeller Fehler, kein Unterschied zwischen Repetierbarkeit und Reproduzierbarkeit nachweisbar sein sollte. Dieses Kriterium wird beim GSA II erfüllt.

Qualitäts-Kontrolle

Für die nachfolgenden Ausführungen über die Qualitäts-Kontrolle ist zu beachten, daß

1. die Harnstoff-Methode des GSA II am 12. 12. 1972 initial ge-eicht wurde und daß seither keine Veränderungen oder Korrekturen vorgenommen wurden und daß
2. alle Reagenzien immer nur dann nachgefüllt wurden, wenn die optisch/akustische Füllstands-Anzeige den Übergang auf das Reserve-Volumen anzeigte.

Aus der für den GSA II gültigen Formel

$$E = \sqrt{E_{\text{SPECIMEN}}^2 + E_{\text{METH}}^2 + E_{\text{APP}}^2}$$

geht hervor, daß bei apparativer Konstanz Abweichungen nur noch dann auftreten können, wenn Fehlein-stellungen am Analysator vorgenommen werden (z. B. falsche Volumen-Einstellung an den Dispensern) oder wenn eine Deterioration der Reagenzien vorliegt. Da es beim GSA II bisher nie gelungen ist, einen apparativen Drift nachzuweisen, muß sich das Augenmerk bei Abweichungen sofort auf die Qualität der Reagenzien lenken.

Nach der Einrichtung der Methode wurde während 3 Monaten eine sehr ausführliche konventionelle Qualitäts-Kontrolle mit vier Kontroll-Seren durchgeführt. Dabei ergaben sich häufig Schwierigkeiten, indem bei der Anlegung von strengen Maßstäben oft ein oder zwei Kontroll-Seren Abweichungen andeuteten, die bei den verbleibenden Kontrollen nicht nachweisbar waren. Wir vermuten, daß auch hier der Proben-Fehler d. h. die Differenzen zwischen den einzelnen Röhrchen der Kontroll-Seren eine Rolle spielt. Wir sind daher zu einem einfacheren System übergegangen, das sich seit einigen Monaten bewährt hat:

1. Routinemäßig wird zweimal täglich eine Qualitäts-Kontrolle durchgeführt, einmal morgens um 8 Uhr und einmal um 18 Uhr.
2. Null-Kontrolle (Zero Control): Eine 0,01 mol/l Essigsäure-Lösung wird einmal analysiert (Wasser ist ungeeignet, da der Niveau-Fühler des Proben-Entnehmers auf dem Prinzip der Konduktometrie arbeitet). Weicht das Resultat signifikant von null ab, d. h. in Absorbanz ausgedrückt mehr als $\pm 0,003$, so bedeutet dies, daß bei der Messung eine Absorbanz-Differenz zwischen den beiden Prozeß-Flüssigkeiten vorliegen muß. Dies ist ein Hinweis darauf, daß entweder ein Reagenz deterioriert (verfärbt) oder kontaminiert (z. B. mit Ammoniak) ist oder aber, daß das Volumen eines Dispensers falsch eingestellt wurde; die zweite Fehlerquelle kann nur nach dem Wechsel eines Dispensers auftreten.
3. Aktivitäts-Kontrolle (Activity Control): Eine beliebige — wäßrige oder protein-haltige — Lösung mit einer Konzentration der zu analysierenden Substanz im oberen Bereich der Linearität der Methode wird einmal untersucht. Diese Kontrolle dient vor allem dazu, die Aktivität von Enzymen oder anderen kritischen Substanzen in den Reagenz-Lösungen zu überwachen.
4. Während des Nachtdienstes wird — aus psychologischen Gründen — bei jeder durchgeführten Bestimmung ein vorher analysiertes Serum mitgeführt.

Die praktische Erfahrung hat gezeigt, daß sich eine weitergehendere Qualitäts-Kontrolle erübrigt. Der Wegfall von Eichungen und die Reduktion der Qualitäts-Kontrolle auf zwei Bestimmungen führt zu einer bedeutenden Kapazitäts-Steigerung.

Praktische Erfahrungen

Die vorliegende Methode wurde seit 1969 auf dem Prototyp Mark I des GSA II zur Durchführung aller routinemäßig anfallenden Harnstoff-Bestimmungen ver-

wendet. Seit Januar 1972 werden alle Bestimmungen auf dem GSA II durchgeführt. Die einzigen Probleme, die gelegentlich auftraten, betrafen die Stabilität der Reagenzien. Es scheint, daß vor allem die Urease-Lösungen trotz des Zusatzes von Azid zu einer bakteriellen Kontamination neigen, die aber — wohl als Folge von entstehendem Ammoniak — rasch bei der Null-Kontrolle erkannt wird.

Danksagung

Für ihre wertvolle Mitarbeit bei den vorliegenden Arbeiten danken wir Frl. M. L. CHRISTENSEN, Frl. H. DAUWALDER, Herrn R. KOECHLI, Frl. R. TAKKINEN und Frl. L. WITTWER. Die Untersuchungen wurden z. T. durch die Fa. Greiner Electronic AG, Langenthal, unterstützt.

Literatur

1. RICHTERICH, R. (1971), *Klinische Chemie, Theorie und Praxis*, 3. Aufl., p. 284—291, Karger, Basel. — 2. WELLER, H. (1962), *Röntgen- und Labor-Praxis* 15, L 77—L 85. — 3. GREINER, R. (1973), *diese Z.* 11, 76—86. — 4. GREINER, R. & JAAG, H. R. (1973), *Techn. Rundschau* 65, 33—39. — 5. KUEFFER, H., COLOMBO, J. P. & RICHTERICH, R. (1970), 7th internat. Congr. Clin. Chem., Proc. 1, 202—206. — 6. RICHTERICH, R. & GREINER, R. (1971), *Automated Multiphasic Health Testing*, p. 124—127, Engeneering Foundation New York. — 7. KUEFFER, H. (1972), *Chem. Rundschau* 25, 325—327. — 8. RICHTERICH, R. & EHRENGRUBER, H. (1968), *Clin. Chim. Acta* 22, 417—422. — 9. LORENTZ, K. (1967), *diese Z.* 5, 293—295. — 10. FAWCETT, J. K. & SCOTT, J. E. (1960), *J. Clin. Pathol.* 13, 156—159. — 11. RICHTERICH, R. & GREINER, R. (1973), *diese Z.* 11, 65—75. — 12. MATHIES, J. C. (1964), *Clin. Chem.* 10, 366—369. — 13. KAPLAN, A. (1965), *Standard Meth. Clin. Chem.* 5, 245—256. — 14. WYBENGA, D. R., DI GIORGIO, J. & PILEGGI, V. J. (1971), *Clin. Chem.* 17, 891—895. — 15. CRENO, R. J., WENK, R. E. & BOHLIG, P. (1970), *Amer. J. Clin. Pathol.* 54, 828—832. — 16. WILSON, B. W. (1966), *Clin. Chem.* 12, 360—368. — 17. MOORE, G. R. (1970), *J. Med. Lab. Technol.* 27, 139—146. — 18. An. Vickers Multichannel 300, Chemistry Method 030 Urea Nitrogen (Issue I, 1. 12. 1971). — 19. CLAUS, I., GRAF, E., RINGHARDT, A. & SCHMITT, A. (1969), *Beiträge zur klinischen Chemie*, Heft 3 (Bodenseewerk Perkin-Elmer & Co. GmbH). — 20. CARAWAY, W. T. (1962), *Amer. J. Clin. Pathol.* 37, 445—464. — 21. HENRY, R. J. (1964), *Clinical Chemistry, Principles and Technics*, Hoeber, New York. — 22. GARB, S. (1971), *Clinical Guide to undesirable drug interactions and interferences*, Springer, New York. — 23. FLEURY, M. P. & EBERHARD, R. (1958), *Ann. Pharm. Fr.* 16, 465—482. — 24. SEARCY, R. L., SIMMS, N. M., FORMANN, J. A. & BERGQUIST, L. M. (1965), *Clin. Chim. Acta* 12, 170—175. — 25. SUNDERMAN, F. W. (1970), *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 7, 427—448. — 26. PRESCOTT, L. F., SANSUR, M., LEVIN, W. & CONNEY, A. H. (1968), *J. Clin. Pharmacol. Therap.* 9, 605—617. — 27. SINGH, H. P., HERBERT, M. A. & GAULT, M. H. (1972), *Clin. Chem.* 18, 137 bis 143. — 28. O'DONOVAN, D. J. (1971), *Clin. Chim. Acta* 32, 59—61. — 29. BROUGHTON, P. M. G., BUTTOLPH, M. A., GOWENLOCK, A. H., NEILL, D. W. & SKENTELBERY, R. G. (1969), *J. Clin. Pathol.* 22, 278—284.

Prof. Dr. R. Richterich
Chemisches Zentrallabor
Inselspital
CH-3010 Bern